云 南 植 物 研 究 2008，30 (3)：340～344
Acta Botanica Yunnanica DOI：10.3724 SP.J.1143.2008.07203

一个巴西橡胶树钙调素基因假基因的识别*

张治礼[1,2]，苏火生[1]，李维国[3]

(1 中国热带农业科学院热带生物技术研究所，海南 海口 571101；2 海南省农业科学院，海南 海口 571100；3 中国热带农业科学院橡胶研究所，海南 儋州 571737)

摘要：以巴西橡胶树（*Hevea brasiliensis*）基因组 DNA 为模板，根据胶乳钙调素基因 *HbCaM* 序列设计引物，利用 PCR 方法克隆获得了 1 319 bp 和 447 bp 的两个 DNA 片段。序列分析表明，1 319 bp 的 DNA 长片段为胶乳钙调素基因 *HbCaM* 的 DNA 片段，含有两个外显子（77 bp 和 373 bp）和 1 个内含子（869 bp），包含了 *HbCaM* cDNA 编码区 447 bp 的全部序列；447 bp 的 DNA 小片段与 *HbCaM* cDNA 核苷酸序列同源性高达 98%，ORF 分析发现，位于 406 bp 处的碱基 C 突变为 T，即三联体密码 CAG 突变为终止子 TAG 使翻译提前终止，其余 5 个差异碱基都不影响或改变正常的翻译。推测此 447 bp 的 DNA 片段为巴西橡胶树钙调素 *HbCaM* 基因的假基因，命名为 *HbCaMP*1。

关键词：巴西橡胶树；钙调素基因；假基因

中图分类号：Q 753 **文献标识码**：A **文章编号**：0253-2700 (2008) 03-340-05

Identification of a Pseudogene of Calmodulin Gene in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae)

ZHANG Zhi-Li[1,2]，SU Huo-Sheng[1]，LI Wei-Guo[3]

(1 *Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology*，*Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences*，Haikou 571101，China；2 *Hainan Academy of Agricultural Sciences*，Haikou 571101，China；3 *Rubber Research*，*Institute Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences*，Danzhou 571737，China)

Abstract: Employing a pair of primers designed from cDNA of a *HbCaM* gene，two 1371 bp and 447 bp-length fragments were isolated from genome DNA in *Hevea brasiliensis*. Sequence analysis showed that the longer fragment was the *HbCaM* gene with 2 exons (including the 77 bp and 373 bp-length fragments) and an 869 bp-length intron，and the shorter fragment had 98% identity with cDNA sequence of *HbCaM* gene. Compared to cDNA of the *HbCaM* gene，6 mutated nucleotides were identified in the 447 bp-length fragment，in which T mutated from C at 406 bp site led to the occurrence of stop codon TAG in advance. The 447 bp-length fragment was hereby suggested to be a pseudogene of the *HbCaM* gene in *H. brasiliensis*，named *HbCaMP*1，which was the first pseudogene in identified *H. brasiliensis* geonome and the first homological pseudogene of CaM genes isolated in plant.

Key words: *Hevea brasiliensis*；Calmodulin gene；Pseudogene

假基因存在于大多数植物基因组中，目前已从拟南芥、水稻、小麦等植物中发现了大量功能基因的假基因。如 Andrson and Green (1997)、Bustosa 等 (2000)、Wan 等 (2002)、陈凡国等 (2005) 分别从小麦基因组中克隆到胚乳贮藏蛋白、醇溶蛋白、麦谷蛋白亚基等功能基因的系列假基因等；许多学者在研究高等植物 ITS 序列时也发现了大量假基因的存在，并从不同角度探讨

* 基金项目：海南省教育厅科技基金 (Hjkj2006024) 和国家自然科学基金 (30760197) 项目

收稿日期：2007-09-14，2007-10-23 接受发表

作者简介：张治礼 (1970-) 男，博士，副研究员，主要从事植物发育生物学、林木分子生物学研究。E-mail：zzl_catas@hotmail.com

了 ITS 区假基因形成的分子机制及其在进化过程中的意义 (Mayol 等，2001；Wei 等，2003；Kumar 等，2004；阚显照等，2007)。虽然目前已积累了大量关于假基因的数据和信息，但关于假基因的确切生理功能及其调控机制目前仍在推测阶段 (Evgeniy 等，2003；Hirotsune 等，2003)，对其认识及研究仍待进一步深入。

乙烯利刺激可以促进巴西橡胶树胶乳增产。施用乙烯利后巴西橡胶树钙调素蛋白分配发生明显改变，以及钙调素参与橡胶生物合成关键酶——HMG-CoA 还原酶活性的调节 (Witisuwannakul，1990) 表明，钙调素及其相关蛋白激酶可能参与了乙烯利刺激巴西橡胶树胶乳增产过程中的分子调控和信号转导。本研究在分离巴西橡胶树钙调素基因的过程中，首次分离、识别了一个巴西橡胶树钙调素基因的假基因 (pseudogene) *HbCaMP*1，这也是首次报道巴西橡胶树基因组中存在假基因以及植物钙调素基因存在有相应的假基因。

1 材料与方法

1.1 植物材料

巴西橡胶树 (*H. brasiliensis* Mull. Arg.) 无性系 7～33～97 种植于中国热带农业科学院橡胶研究所试验基地。以胶乳和幼嫩叶片为材料分别提取总 RNA 和 DNA。

1.2 实验试剂

反转录试剂盒购自 Promega 公司，PCR 试剂购自上海申能博彩公司，DEPC、IPTG 和 X-Gal 等购自上海生物工程公司，其他常规生化试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 巴西橡胶树基因组 DNA 和总 RNA 提取

利用张治礼等 (2007) 的方法提取巴西橡胶树胶乳总 RNA，利用 Promega 公司提供的反转录试剂盒并参照说明书反转录合成 cDNA 第一链；利用常规 SDS 法提取巴西橡胶树叶片基因组 DNA。

1.4 巴西橡胶树胶乳钙调素基因 cDNA 克隆

根据 GenBank 中公布的巴西橡胶树胶乳钙调素基因 cDNA 序列 (注册号为 AY830128) 设计引物 P1：5′-GGCATGGCGGATCCGCTCACCGACGA-3 和 P2：5′-TCCCTACTTGGCCATCATGACCTTG-3′，委托上海申能博彩公司合成。

以从巴西橡胶树胶乳中提取的 RNA 反转录 cDNA 为模板克隆钙调素基因 cDNA。扩增程序为：94℃预变性 3 min，94℃变性 30 s，55℃退火 30 s，72℃延伸 60 s，30 个循环后 72℃保温 7 min。取 5 μl PCR 反应液电泳检测。

1.5 巴西橡胶树钙调素蛋白基因 DNA 片段克隆

以巴西橡胶树叶片 DNA 为模板，利用引物 P1/P2 克隆钙调素基因 DNA 片段。扩增程序为：94℃预变性 4 min，94℃变性 30 s，52℃退火 30 s，72℃延伸 3 min，30 个循环后，72℃保温 7 min。取 5 μl PCR 反应液电泳检测。

1.6 序列分析

利用 GenBank 提供的 Blast、ORF、Alingment 等分析程序对序列进行分析。

2 结果与分析

2.1 钙调素基因 cDNA 克隆

以从巴西橡胶树胶乳中提取的 RNA 反转录 cDNA 第一链为模板，利用 P1/P2 引物扩增获得了一条长约 450 bp 的特异性条带 (图 1)。回收克隆并测序，利用 GenBank 提供的软件分析表明，此片段为巴西橡胶树钙调素基因 cDNA 447 bp 的编码区全长序列，与 GenBank 公布的巴西橡胶树钙调素基因 (注册号为 AY830128) 序列具有 100％的同源性。

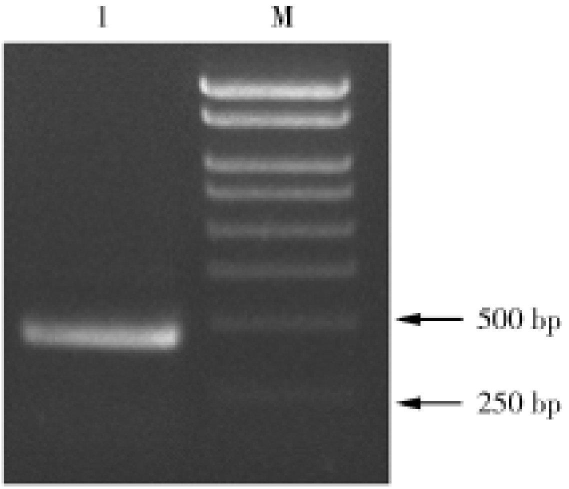

图 1 巴西橡胶树钙调素基因 cDNA 编码区全长克隆
(1，PCR 扩增产物；M，Marker)
Fig. 1 cDNA fragment of full ORF encoding calmodulin from *H. brasiliensis* (1，PCR product；M，Marker)

2.2 钙调素基因 DNA 片段克隆及其假基因识别

以叶片基因组 DNA 为模板、P1 P2 为引物，扩增了钙调素基因的 DNA 片段。图 2 显示，有两条特异性较强的条带获得扩增。测序结果表明，扩增的大片段含有 1 319 个碱基，包含了上述钙调素基因 cDNA 编码区 447 bp 的全部序列，但被一条 869 bp 的内含子隔开，即巴西橡胶树胶乳钙调素基因 *HbCaM* 含有两个外显子 (77 bp 和 373 bp) 和 1 个内含子 (869 bp)。扩增的 DNA 小片段与上述克隆的巴西橡胶树钙调素基因 HbCaM cDNA 编码区大小完全相同，核苷酸同源性

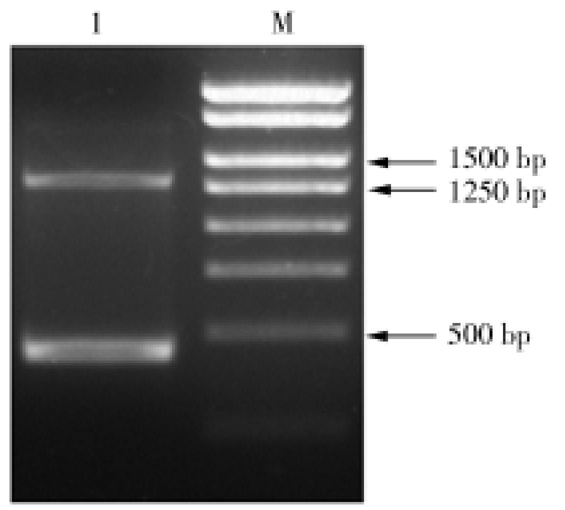

图 2 巴西橡胶树钙调素基因 DNA 序列克隆

(1, PCR 产物; M, Marker)

Fig . 2 DNA fragments of calmodulin gene amplified from *H. brasiliensis* genome (1, PCR products; M, Marker)

高达 98% (图 3), 仅有 6 个碱基的差异。ORF 分析及推导氨基酸序列时发现, 该片段在 406 bp 处的碱基 C 突变为 T, 即由 CAG 突变成为终止子 TAG 使翻译提前终止。其余 5 个差异碱基都没有影响或改变氨基酸的翻译, 其余推导的编码氨基酸与上述克隆的钙调素蛋白基因 cDNA 编码区编码的氨基酸完全相同 (图 4)。

假基因主要包括以下几种类型: (1) 没有内含子、原来基因内的蛋白转译区含有一个或数个蛋白转译终止码的基因; (2) 虽然含有数个外显子, 但其基因前无具有功能的启动子, 或是原来基因内的蛋白转译区含一个或数个蛋白转译终止码, 或缺少可信的基因外显子的基因; (3) 没有

```
HbCaM gene cDNA       1    ATGGCGGATCCGCTCACCGACGACCAGATCTCTGAGTTCAAGGAAGCCTTCAGCCTCTTT  60
                           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Predicted pseudogene  1    ATGGCGGATCCGCTCACCGACGACCAGATCTCTGAGTTCAAGGAAGCCTTCAGCCTCTTT  60

HbCaM gene cDNA       61   GATAAGGATGGCGATGGCTGCATTACTACTAAGGAACTTGGCACTGTAATGCGTTCGCTG  120
                           ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Predicted pseudogene  61   GATAAAGATGGCGATGGCTGCATTACTACTAAGGAACTTGGCACTGTAATGCGTTCGCTG  120

HbCaM gene cDNA       121  GGGCAGAACCCAACTGAAGCAGAGCTCCAGGACATGATAAATGAAGTTGATGCTGATGGG  180
                           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Predicted pseudogene  121  GGGCAGAACCCAACTGAAGCAGAGCTCCAGGACATGATAAATGAAGTTGATGCTGATGGG  180

HbCaM gene cDNA       181  AATGGTACTATTGATTTCCCGGAGTTCCTTAATCTGATGGCCCGTAAGATGAAGGACACT  240
                           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Predicted pseudogene  181  AATGGTACTATTGATTTCCCGGAGTTCCTTAATCTGATGGCCCGTAAGATGAAGGACACT  240

HbCaM gene cDNA       241  GATTCTGAGGAAGAGCTCAAGGAAGCTTTCCGGGTTTTTGATAAGGATCAGAACGGCTTC  300
                           ||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||| ||||||
Predicted pseudogene  241  GATTCTGAGGAAGAGCTCAAGGAGGCTTTCCGGGTTTTTGATAAGGATCAGAATGGCTTC  300

HbCaM gene cDNA       301  ATTTCTGCTGCTGAACTTCGCCATGTTATGACAAATCTTGGTGAGAAGCTGACAGATGAG  360
                           |||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Predicted pseudogene  301  ATTTCTGCTGCTGAACCTCGCCATGTTATGACAAATCTTGGTGAGAAGCTGACAGATGAG  360

HbCaM gene cDNA       361  GAGGTTGATGAGATGATCCGTGAGGCGGATGTGGATGGTGATGGACAGATCAACTATGAG  420
                           |||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||
Predicted pseudogene  361  GAGGTTGATGTGATGATCCGTGAGGCGGATGTGGATGGTGATGGATAGATCAACTATGAG  420

HbCaM gene cDNA       421  GAGTTTGTCAAGGTCATGATGGCCTAG  447
                           |||||||||||||||||||||||||||
Predicted pseudogene  421  GAGTTTGTCAAGGTCATGATGGCCTAG  447
```

图 3 巴西橡胶树钙调素基因 *HbCaM* cDNA 编码区与预测的钙调素假基因的序列比较

Fig . 3 Alignment of calmodulin gene cDNA ORF and predicted pseudogene from *H. brasiliensis*

```
1    atggcggatccgctcaccgacgaccagatctctgagttcaaggaa
     M  A  D  P  L  T  D  D  Q  I  S  E  F  K  E
46   gccttcagcctctttgataaagatggcgatggctgcattactact
     A  F  S  L  F  D  K  D  G  D  G  C  I  T  T
91   aaggaacttggcactgtaatgcgttcgctggggcagaacccaact
     K  E  L  G  T  V  M  R  S  L  G  Q  N  P  T
136  gaagcagagctccaggacatgataaatgaagttgatgctgatggg
     E  A  E  L  Q  D  M  I  N  E  V  D  A  D  G
181  aatggtactattgatttcccggagttccttaatctgatggcccgt
     N  G  T  I  D  F  P  E  F  L  N  L  M  A  R
226  aagatgaaggacactgattctgaggaagagctcaaggaggctttc
     K  M  K  D  T  D  S  E  E  E  L  K  E  A  F
271  cgggtttttgataaggatcagaatggcttcatttctgctgctgaa
     R  V  F  D  K  D  Q  N  G  F  I  S  A  A  E
316  cctcgccatgttatgacaaatcttggtgagaagctgacagatgag
     P  R  H  V  M  T  N  L  G  E  K  L  T  D  E
361  gaggttgatgtgatgatccgtgaggcggatgtggatggtgatgga
     E  V  D  V  M  I  R  E  A  D  V  D  G  D  G
406  tag 408
```

图 4 巴西橡胶树钙调素假基因编码氨基酸预测

(406 bp 处的 C 突变为 T，即密码子 CAG 突变为终止密码子 TAG 使翻译提前终止)

Fig．4 Predicted amino acid sequence from deduced CaM pseudogene from *H*. *brasiliensis*

(C mutated to T at 406 bp site results in stop codon TAG)

内含子的基因，其最后一个外显子含有 Poly (A)，基因前无可信度高、具有功能的启动子；(4) 已知位于其他染色体上的基因，在一持续性异染色质（constitutive heterochromatin）上存在的复本基因也被称为假基因（许亮等，2003；黄志华和薛庆中，2006）。本研究获得的 447 bp 的 DNA 小片段完全符合假基因类型（1）的定义，推测认为这条与钙调素基因 cDNA 高度同源、没有内含子、蛋白转译区含有一个蛋白转译终止码的 DNA 片段是巴西橡胶树钙调素 HbCaM 基因相应的假基因，根据假基因的命名法则命名为 Hb-CaMP1（GenBank 注册号为 EU219367）(许亮等，2003；黄志华和薛庆中，2006)。

3 讨论

假基因的概念最初由 Jacq 等（1977）提出。自 1977 年在爪蟾的 5S 基因系统中发现假基因以来，人们已在线虫、果蝇、酵母基因组、人类基因组以及拟南芥、水稻等植物基因组中发现了大量假基因的存在。假基因普遍存在，但关于假基因的确切功能目前并不清楚。现在大家公认假基因并不是冗余基因，假基因的存在可能为物种进化的正选择、负选择以及中性漂变提供了丰富的材料，从而成为物种进化不可缺少的有用工具(Emile，2002；Hirotsune 等，2003)。有报道认为，假基因可以作为细胞内的抑制因子而存在，并推测假基因可能从反义链上转录了其功能基因相应的转录产物，类似反义 RNA 形式阻止了相应正常基因的表达（Evgeniy 等，2003)。我国学者 Shi 等（2005）发现，病原菌诱导条件下水稻 TNP2 类转座酶的假基因 *Rim*2-42 因子可以被诱导表达，其转录本被选择性剪接和加尾且在不同的水稻亚种中的剪接方式也不相同，可以形成 7 种不同的转录本结构。这一发现暗示，假基因不仅具

有特定的生理或调控功能，其功能可能具有多样性。根据现有的数据和证据推测，通过假基因的表达调控正常基因的作用有可能是生物界普遍存在的另一种新的调控模式或调控途径，这一推测如果能最终得到证实，将使我们不得不重新审视生物基因调控的复杂性，具有重要的理论意义。

钙调素广泛存在于生物体内，是一类保守的钙离子结合蛋白，在钙信号传导过程中发挥重要的作用。乙烯利刺激巴西橡胶树后钙调素蛋白分配发生明显改变，以及钙调素参与橡胶生物合成关键酶 HMG-CoA 还原酶活性的调节（Witisuwannakul，1990）表明，巴西橡胶树钙调素基因可能是乙烯利刺激巴西橡胶树的响应基因之一并参与了橡胶生物合成的调控。研究巴西橡胶树钙调素蛋白及其相关基因，有助于我们了解乙烯利刺激巴西橡胶树增产的分子机制。本研究报道了巴西橡胶树钙调素基因的结构及其相应假基因的存在，对我们正确认识巴西橡胶树钙调素基因功能与调控、钙调素基因进化等具有积极意义。

〔参 考 文 献〕

Andrson OD, Green EFC, 1997. The characterization and comparative analysis of high molecular weight glutenin genes from genomes A and B of a hexaploid bread wheat [J]. *Theor Appl Genet*, **77**: 689—700

Bustosa D, Rubio P, Jouve N, 2000. Molecular characterization of the inactive allele of the gene *Glu2A*1 and the development of a set of A S2PCR markers for HMW glutenins of wheat [J]. *Theor Appl Genet*, **100**: 1085—1094

Chen FG (陈凡国), Zhu XY (朱翔宇), Xia GM (夏光敏), 2005. Sequence of a new HMW gluten in subunit gene in *Haynald iavillosa* [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), **25** (7): 1410—1414

Emile Zuekerkandl, 2002. Why so many noncoding nucleotides? The eukaryote genome as an epigenetic machine [J]. *Genetica*, **115**: 105—129

Evgeniy S, Balakirew, Francisco J *et al.*, 2003. Pseudogene: are they "junk" or functional DNA? [J]. *Ann Rev Genet*, **37**: 123—151

Hirotsune S, Yoshida N, Chen A *et al.*, 2003. An expressed pseudogene regulates the messenger-RNA stability of its homologous coding gene [J]. *Nature*, **423** (6935): 91—96

Huang ZH (黄志华), Xue QZ (薛庆中), 2006. Composition and distribution of pseudogenes and their molecular evolution [J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), **23** (4): 402—408

Jacq C, Miller JR, Brownlee GG, 1977. A pseudogene in 5SDNA of Xenopus Laevis [J]. *Cell*, **13**: 109—120

Kan XZ (阚显照), Qiao CY (乔才元), Zhu GP (朱国萍) *et al.*, 2007. Molecular clone and sequencing analysis on pseudogenized copy of nrDNA ITS region in *Nothotsuga longibracteata* [J]. *Acta Laser Biol Sin* (激光生物学报), **16** (2): 208—215

Kumar S, Tamura K, Neim M, 2004. Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Brief Bioinform*, **5** (2): 150—163

Mayol M, Rossello JA, 2001. Why nuclear ribosomal DNA spacers (ITS) tell different stories in *Quercus* [J]. *Mol Phylogenet Evol*, **19** (2): 167—176

Shi XR, Li Q, He ZH, 2005. Stress-induced *Rim2*/*Hipa* pseudogene of rice exhibits alternative tailing and splicing during transcription [J]. *J Plant Physiol Mol Biol*, **31** (6): 607—614

Wan Y, Wang D, Shewry PR *et al.*, 2002. Isolation and characterization of five novel high molecular weigh t subunit of glutenin genes from *Triticum timopheevi* and *Aegilop scylindrical* L. [J]. *Theor Appl Genet*, **104**: 828—839

Wei XX, Wang XQ, Hong DY, 2003. Marked intragenomic heterogeneity and geographical differentiation of nrDNA ITS in *Larix potaninii* (Pinaceae) [J]. *J Mol Evol*, **57** (6): 623—635

Witisuwannakul R, 1990. Hevea calmodulin regulation of the activity of latex HMG-C0A reductase [J]. *Phytochemistry*, **29**: 1755—1758

Xu L (许亮), Lu XY (卢向阳), Yi K (易克) *et al.*, 2003. On research progresses on pseudogene [J]. *Chemistry of Life* (生命的化学), **23** (6): 406—409

Zhang ZL (张治礼), Yan Y (杨云), Liu KC (刘宽灿) *et al.*, 2007. A rapid and efficient protocol for total RNA isolation from latex of *Hevea brasiliensis* [J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), **24** (4): 516—520